

MARCOS AURÉLIO ARAÚJO GODINHO

**NÍVEL DE LUMINOSIDADE ENTRE OS BRAÇOS FECHADOS DO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO: UMA ALTERNATIVA PARA
MELHORAR A VALIDADE DE PREDIÇÃO DO MODELO.**

**Florianópolis – SC
2007**

MARCOS AURÉLIO ARAÚJO GODINHO

**NÍVEL DE LUMINOSIDADE ENTRE OS BRAÇOS FECHADOS DO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO: UMA ALTERNATIVA PARA
MELHORAR A VALIDADE DE PREDIÇÃO DO MODELO.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
curso de Pós-graduação em Neurociências
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Serralvo Faria

Florianópolis – SC

2007

**“NÍVEL DE LUMINOSIDADE ENTRE OS BRAÇOS FECHADOS DO LABIRINTO EM
CRUZ ELEVADO: UMA ALTERNATIVA PARA MELHORAR A VALIDADE DE
PREDIÇÃO DO MODELO”**

MARCOS AURÉLIO ARAÚJO GODINHO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Orientador

Prof. Dr. Moacir Serralvo Faria

Coordenador do Curso

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Banca Examinadora

Prof. Dr. Moacir Serralvo Faria

Prof. Dr^a. Thereza Christina M. de Lima Nogueira (membro)

Prof. Dr. Roger Walz (membro)

Este trabalho é dedicado ao meu Orientador Prof. Dr. Moacir Serralvo Faria, a Minha Esposa Flávia Cristina da Rosa Capistrano Godinho e ao Meu Filho Mateus Capistrano Godinho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela vida, e por sempre me guiar para o caminho do sucesso.

Agradeço imensamente a minha família; a meu pai por ser mais que um pai, mas sim um verdadeiro amigo e conselheiro; Pai, muito obrigado! A minha mãe, sempre pensando positivamente e sempre pronta para me ouvir; Mãe, obrigado por tudo mesmo! Obrigado a vocês dois por terem me dado o dom da vida e por hoje eu estar aqui, e por me aturarem neste período!

A pessoa mais importante da minha vida, minha amada esposa Flávia; *“Como é grande, o meu amor, por você!”* Amor, obrigado por sempre estar ao meu lado, me apoiando, me aconselhando, me ajudando e por sempre me dar força neste período que passamos, pois você sabe como foi difícil encarar estes dois anos. Desculpe-me por passar por chato, em alguns momentos, comentando contigo os problemas do mestrado! Mas sei que tudo foi por uma causa nobre! Olhe, hoje estou aqui, acabou!

Ao grande presente que Deus me deu: meu filho Mateus, pois sempre com aquele sorriso estampado no rosto, me alegrava quando eu estava triste e chateado! Meu filho desculpe-me por em alguns momentos eu não ter te dado mais dedicação, em função dos estudos, mas nunca esqueci de você, você sempre esteve e sempre estará no coração do papai, Deus te abençoe meu filho! Papai te ama muito!

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Moacir Serralvo Faria, por quem tenho respeito e admiração. Obrigado pelos ensinamentos científicos, éticos e profissionais,

ajuda e orientação e por ter confiado em mim, sou muito grato a ti. cara! Valeu por tudo mesmo! Muitas felicidades para você!

Aos meus grandes amigos, que considero os irmãos que não tive: Daniel e Luiz. Daniel; valeu pela parceria, pelas boas geladas que tomamos juntos e as que ainda vamos tomar e, acima de tudo; por ser meu amigo! Luiz valeu pelos sempre bem vindos e valiosos conselhos; sou muito grato a ti, cara, e valeu também por ser meu amigo!

As minhas grandes amigas Luana e Marina: Luana valeu por ter me ajudado e ensinado os procedimentos durante os experimentos, valeu mesmo! Luana, te desejo toda sorte do mundo, pois você merece; que Deus sempre te abençoe para você continuar sendo a grande profissional que você é! Marina, companheira de guerra e luta; sempre pronta para discutir as questões relacionadas à nossa profissão! Marina, a luta continua. Um dia você vai ver que também teremos um lugar ao sol, e você bem sabe onde é este lugar ao sol! Obrigado por tudo amiga!

Aos amigos de laboratório, Márcia, Fábio, Isabel, Diane e Ana Paula Fraga por serem colaboradores deste estudo e parceiros em diversos momentos. Que Deus abençoe a todos vocês e muito sucesso para vocês também!

Aos Professores da UDESC-CEFID em especial: Prof. Dr. Alexandro Andrade, por sempre estar torcendo por mim; Prof. Dr. Gilmar Moraes Santos, por ter sido um grande mestre ontem, hoje e sempre, por confiar em mim e pelos ensinamentos. À Prof^a. M.S.c. e Doutoranda, Fabiana Esperandio, por sempre me aconselhar, apoiar e ser uma grande colega de profissão. E, por último, porém, não menos importante agradeço à Prof^a. M.S.c. Deborah de Camargo Hizume, por estar sempre acreditando e torcendo por mim. E a todos os outros professores que de

alguma forma torcem e acreditam em mim! Muito obrigado a todos vocês, vejam o quanto os ensinamentos de vocês fizeram-me crescer profissionalmente para hoje eu estar aqui! Meu sonho é um dia voltar a lecionar junto com vocês, quem sabe? Só Deus e o destino dirão!

A Prof^ª. Dr^ª. Vilca Marlene Merízio, pela correção ortográfica.

A Prof^ª. Mayra Alexandrino pela revisão do abstract.

Aos funcionários, em especial ao Carlos Hercílio Espíndola (Seu Carlos), pelo bom dia e bom humor e, acima de tudo, por ser flamenguista também! Ao Nivaldo e à Ana Cláudia; Nivaldo, obrigado por sempre ser prestativo; Ana Cláudia, obrigado por que sempre que possível, esteve pronta para me ajudar!

Aos membros da banca por aceitarem o convite e pelas contribuições para o trabalho.

A todos que de alguma forma, colaboraram para a realização deste.

E, é claro, como poderia de esquecer dos animais, que contribuíram de forma involuntária com suas vidas para a realização deste estudo em prol da pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Medo e ansiedade.....	15
1.2. Modelos animais de ansiedade.....	17
1.2.1. Validação de modelos animais de ansiedade.....	18
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Objetivos Específicos	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Animais.....	28
3.2 Drogas.....	29
3.3. Labirinto em cruz elevado	30
3.4. Procedimentos	35
3.4.1. Experimento 1: Influência das alterações na A/F Δ Lux na detecção de drogas ansiolíticas no LCE.....	35
3.4.2. Experimento 2: Influência do F/F Δ lux na preferência dos animais pelos braços fechados do LCE; e sobre a avaliação da discriminação visual do animal no LCE	36
3.4.3. Experimento 3: Influência do F/F Δ Lux na detecção de drogas ansiolíticas e em drogas indutoras de prejuízo na discriminação visual do animal no LCE...	36
3.5 Análise estatística	37
4. RESULTADOS	39
4.1. Influência das alterações na A/F Δ Lux na detecção de drogas ansiolíticas no LCE	39
4.2 Influência do F/F Δ lux na preferência dos animais pelos braços fechados do LCE; e sobre a avaliação da discriminação visual do animal no LCE	42

4.3 Influência do F/F Δ Lux na detecção de drogas ansiolíticas e em drogas indutoras de prejuízo na discriminação visual do animal no LCE.....	44
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO	56
7. Referências bibliográficas.....	58
ANEXOS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rato Wistar	29
Figura 2 – Labirinto em cruz elevado (LCE).....	32
Figura 3 – Sala de experimentação e iluminação.....	32
Figura 4 – LCE 8 lux (A), LCE 10 lux (B), LCE 41 lux (C), LCE 85 lux (D)	34
Figura 5 - Porcentagem de entrada (A) e de tempo de permanência nos braços abertos (B), em ratos tratados com salina 0,9% e midazolam 1,0mg/kg e submetidos a configurações de LCE com diferentes F/FΔlux.	40
Figura 6 - Número de entradas nos braços abertos (A) e número de entradas nos braços fechados (B), em ratos tratados com salina 0,9% e midazolam 1,0mg/kg e submetidos a configurações de LCE com diferentes F/FΔlux	41
Figura 7 - Porcentagem de entrada nos braços abertos (A), de tempo de permanência nos braços abertos (B), número de entradas nos braços abertos (C), número de entradas nos braços fechados (D), porcentagem de entradas no braço fechado mais iluminado (E) e porcentagem de tempo de permanência no braço fechado mais iluminado (F) de ratos que foram tratados com salina 0,9% e após 30 minutos foram submetidos a configurações de LCE, com F/FΔlux 8,41 e 85 lux.....	43

Figura 8 - Porcentagem de entrada (A) e de tempo de permanência nos braços abertos (B) de ratos que foram submetidos a configurações de LCE com $F/F\Delta lux$ 46

Figura 9 - Número de entradas nos braços abertos (A) e número de entradas nos braços fechados (B) de ratos que foram submetidos a configurações de LCE com $F/F\Delta lux$ 47

Figura 10 - Porcentagem de entradas no braço fechado mais iluminado (A) e porcentagem de tempo de permanência no braço fechado mais iluminado (B) de ratos que foram submetidos a configurações de LCE com $F/F\Delta lux$ 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação dos transtornos de ansiedade de acordo com o manual DSM-IV (1994)

.....16

Tabela 2- Níveis de luminosidade em diferentes configurações dos braços fechados do LCE..... 34

Tabela 3- Experimento 1 Resultados da ANOVA de duas vias indicando os efeitos principais e interações no experimento 1 40

Tabela 4- Experimento 2 Resultados da ANOVA de uma via indicando os efeitos principais e interações no experimento 2 42

Tabela 5- Experimento 3 Resultados da ANOVA de duas vias indicando os efeitos principais e interações no experimento 3 45

RESUMO

O efeito do gradiente de luminosidade entre os braços fechados ($\Delta F/F$) do labirinto em cruz elevado (LCE) sobre o nível de medo/ansiedade de ratos foi investigado no presente estudo. Ratos Wistas Machos foram testados em quatro configurações do LCE, com os braços fechados construídos da seguinte forma: vidro fumê ($A/F\Delta lux=89$ lux e $F/F\Delta lux=8$ lux), vidro transparente ($A/F\Delta lux=8$ lux e $F/F\Delta lux=10$ lux), um braço fechado com vidro fumê e o outro com vidro transparente ($A/F\Delta lux=58$ lux e $F/F\Delta lux=41$ lux) e um braço fechado com vidro fumê e o outro com madeira ($A/F\Delta lux=117$ lux e $F/F\Delta lux=85$ lux). O experimento 1 verificou se a diferença de luminosidade entre os braços abertos e fechados ($\Delta A/F$) poderia prejudicar a detecção de drogas com potencial ansiolítico. Os animais foram tratados (via i.p.) com salina (0,9%) ou Midazolam (1,0 mg/kg) e, após 30 minutos, submetidos a configurações de LCE com $A/F\Delta lux$ de 8 e 89 lux por 5 minutos. O experimento 2 verificou se animais controle são hábeis em discriminar braços fechados do LCE com diferenças de luminosidade ($\Delta F/F$). Os animais foram tratados (via i.p.) com salina (0,9%) e, após 30 minutos, testados em configurações de LCE com $F/F\Delta lux$ de 8, 41 e 85 lux por 5 minutos. O objetivo do experimento 3 foi verificar se os LCEs com ($\Delta F/F$) de 41 e 85 reconhecem drogas com potencial ansiolítico (MDZ), e drogas que prejudicam a discriminação visual dos animais, como a Escopolamina (ESC). Os animais foram tratados (via i.p.) com salina (0,9%), MDZ (1,0 mg/kg) ou ESC (um antagonista muscarínicos; 1,0, 2,0 e 8,0 mg/kg), e após 30 minutos, foram submetidos ao teste do LCE com duração de 5 minutos, nos labirintos com $F/F\Delta lux$ de 41 e 85. A porcentagem de entrada e de permanência nos braços abertos (%EA e %TA), número de entradas nos braços abertos e fechados (EA e EF) e porcentagem de entrada e de permanência no braço fechado mais claro (%EBFC e %TBFC) foram avaliados. Os resultados do experimento 1 mostraram que o efeito ansiolítico do MDZ pôde ser observado apenas no LCE com $A/F\Delta lux=89$. Por outro lado, o efeito ansiolítico do MDZ não foi visto no LCE com $A/F\Delta lux=8$, o que pode ser atribuído à baixa ($\Delta A/F$). No experimento 2 os animais tratados com salina (0,9%) exibiram baixa (%EBFC e %TBFC), nos LCEs $F/F\Delta lux$ de 41 e 85 Lux, em relação ao LCE $F/F\Delta lux=8$, o que indica que os animais discriminam e evitam explorar o braço fechado mais claro do labirinto, sem alteração nas demais variáveis espaciais temporais. No experimento 3, o tratamento com MDZ (1,0 mg/kg) induziu o efeito ansiolítico clássico nos LCE com $F/F\Delta lux$ de 41 e 85 Lux, sem alterar a atividade locomotora dos animais e nem a discriminação visual dos mesmos, visto que não alterou a %EBFC e %TBFC. O tratamento com ESC (2,0 mg/kg) também induziu efeito ansiolítico sem alteração da discriminação visual, enquanto o tratamento com ESC (8,0 mg/kg) induziu o efeito ansiolítico e/ou prejuízo na discriminação visual dos animais. Nossos resultados indicam que a inclusão de um $F/F\Delta lux$ no LCE pode permitir ao modelo a avaliação do nível de ansiedade e da discriminação visual no mesmo animal, evitando que um efeito prejudicial da droga sobre o sistema visual seja confundido com um efeito ansiolítico clássico e, conseqüentemente, a ocorrência de resultados falsos positivos.

ABSTRACT

Previous research has shown that the visual system is important for rats to establish the arm preference in the elevated plus maze (EPM), an animal model of anxiety. This study aims at evaluating whether a gradient of illumination between the enclosed arms of the maze (E/E Δ lux) could be a reliable approach to detect drugs-induced harmful effect on visual discrimination of rats. Four EPM configurations with different E/E Δ lux (8, 41 and 85 lux) were used to demonstrate that as E/E Δ lux increases, rats avoid to explore the light enclosed arm, which characterizes the animal ability to discriminate the most illuminated area within the protected environment of the maze. The establishment of either 41 or 85 E/E Δ lux failed to alter the traditional spatial-temporal variables in the EPM. In addition, systemic treatment with midazolam (MDZ; 1.0 mg/kg, a classical anxiolytic) induced anxiolysis in rats tested in 41 and 85 E/E Δ lux EPM, with no change in the visual discrimination, when evaluated by the level of light enclosed arm exploration. Systemic treatment with scopolamine (SCP; 1.0, 2.0 and 8.0 mg/kg), a drug endowed with harmful properties upon the visual system, did not change either the open arm avoidance or the visual discrimination at the low doses, but induced increased light enclosed arm (visual discrimination deficit) and open arm exploration (anxiolytic like effect) at a higher dose. We propose that the incorporation of an E/E Δ lux in the EPM may reinforce the predict validity of the test since it enables to evaluate whether a visual discrimination deficit can be confounded with an anxiolytic-like effect, thus establishing a false positive detection.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Medo e ansiedade

A ansiedade e o medo representam o primeiro sistema de defesa corporal contra um estímulo ameaçador ou perigo iminente (LEPINE, 2003; GRAY, 1982). Medo é uma reação normal contra situações ameaçadoras e é de ocorrência comum na vida diária (LeDOUX, 1998). A ansiedade representa uma resposta do organismo a um estímulo ameaçador desconhecido ou a um conflito interno, enquanto o medo envolve uma resposta a um estímulo ameaçador reconhecido. A ansiedade pode ser duradoura, pois não existe um estímulo óbvio para ser evitado ou para se fugir. Medo e ansiedade possuem definições próprias; contudo, alguns autores não fazem distinção entre os dois termos, tratando-os como um único fenômeno (JULOU, BLANCHARD & DREYFUS, 1985), enquanto outros os consideram estados emocionais diferentes (APPELBAUM, 1992).

Sensações de ansiedade são partes da experiência humana (GROSS & HEN, 2004); porém, quando a ansiedade é excessiva ou inapropriada (estado patológico), levando a situações extremas de angústia, aflição no indivíduo, ou em sua família, ou até mesmo na sociedade em geral, ela se torna uma doença (GROSS & HEN, 2004; SANDFORD, ARGYROPOULOS & NUTT, 2000, ver tabela 1).

Tabela 1 – Classificação dos transtornos de ansiedade de acordo com o manual DSM-IV (1994).

NOME	DESCRIÇÃO
Transtorno do pânico	Freqüentes ataques de pânico, consistindo de episódios de início súbito, com intensa apreensão, medo extremo e terror, geralmente associados com sentimentos de morte iminente.
Agorafobia	Ansiedade, esquiva de lugares ou de situações inusitadas, cuja fuga, pode ser difícil ou embaraçosa, ou o socorro pode não ser possível, no caso de um ataque de pânico.
Transtorno obsessivo-compulsivo (TOC)	Caracterizado pela obsessão que pode causar marcada ansiedade ou perturbação e/ou compulsão, que, por sua vez, poderá neutralizar a ansiedade.
Transtorno de ansiedade generalizada	Aproximadamente seis meses de ansiedade e apreensão excessiva.
Fobias específicas	Ansiedade provocada pela exposição a um objeto, ou situação específica, capaz de induzir comportamento aversivo.
Fobia Social	Ansiedade provocada pela exposição a certos tipos de situações sociais, em geral, levando a comportamentos aversivos.
Transtorno de estresse pós-traumático	Lembrança de um evento extremamente traumático, acompanhada por sintomas de hiperatividade e de esquiva dos estímulos associados ao trauma.

A ansiedade é acompanhada por alterações comportamentais, emocionais e fisiológicas, como esquiva, vigilância, apreensão, nervosismo, inquietação, tensão,

pânico e agitação, o que leva o indivíduo a proteger-se em situações de perigo (GROSS & HEN, 2004). Via de regra, a ansiedade é acompanhada por sinais de hiperatividade simpática, tais como tremores, sudorese, aumento da pressão arterial e taquicardia (LEPINE, 2003; VAN RIEZEN & SEGAL, 1988). As alterações psicofísicas que compõem o medo são semelhantes às da ansiedade, podendo-se admitir a identidade básica dos mecanismos neurais que integram ambos os estados emocionais (GRAEFF, 1989).

Do ponto de vista evolucionário, pode ser postulado que o centro anatômico do medo/ansiedade é representado por um conjunto de estruturas límbicas interrelacionadas, tais como o sistema septo-hipocampal, o complexo amidalóide e as áreas do hipotálamo, bem como a substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo (BERGINK, VAN MEGEN & WESTENBERG, 2004). À medida que os mamíferos foram submetidos a constantes desafios de sobrevivência, essas circuitarias neuronais mencionadas passaram a se aperfeiçoar, tornando-se responsáveis pelo controle de estratégias comportamentais contra situações ameaçadoras em seu habitat (padrões adequados de defesa) (LeDOUX, 1998). O comportamento defensivo pode ainda ser acompanhado de intensas alterações neurovegetativas e endócrinas, o que demonstra que o medo e a ansiedade são estados psicobiológicos, expressados simultaneamente nos níveis psicológico, comportamental e fisiológico (GRAEFF *et al.*, 1993).

1.2 Modelos animais de ansiedade

Modelos animais têm permitido avanços na neurobiologia da ansiedade. O objetivo é simular em animais, sob condições controladas e reproduzíveis, os mesmos

sinais observados em pacientes diagnosticados com distúrbio de ansiedade. Diversos modelos animais de ansiedade têm sido desenvolvidos para testar novas drogas ansiolíticas e para o entendimento dos mecanismos neurais da ansiedade (SALUM; MORATO & ROQUE-DA-SILVA, 2000). Em neurociências comportamentais, tais como a neurobiologia e biopsicologia, modelos animais permitem investigações das relações comportamentais cerebrais, com o objetivo de obter a perspicácia dentro do comportamento humano e seus processos neurais fundamentais e neuroendocrinológicos (VAN DER STAAY, 2006).

O animal possui capacidade de processar estímulos e contextos físicos e de compará-los com expectativas formadas a partir de informações armazenadas na memória. Essas experiências prévias, ou informações arquivadas, são fundamentais para a detecção e a avaliação de uma nova situação, seja de ataque ou perigo eminente, e para a escolha de uma estratégia comportamental a ser adotada para fugir ou evitar situações perigosas e manter sua sobrevivência (GRAEFF, 1990).

1.2.1 Validação de modelos animais de ansiedade

Para que um modelo animal possa ser considerado útil para estudos da ansiedade, existe a necessidade de ser previamente validado. Por essa razão, foram propostos, ao longo do tempo, por diversos estudos, critérios de validação que, na pesquisa neurobiológica, têm o papel de garantir que um modelo seja capaz de simular uma determinada patologia humana, promovendo, assim, a compreensão de seus mecanismos neurobiológicos (BLOOM & KUPFER, 1995).

Na seqüência, listam-se alguns dos critérios:

Validade de predição: Definida como a habilidade de um modelo em prever o comportamento de uma variável que é de interesse do pesquisador. (CRONBACH & MEEHL, 1955). Em modelos animais de psicopatologia humana, o termo predição é utilizado para referir-se ao modelo como sendo capaz de identificar o efeito de um determinado fármaco utilizado (MATTHYSSE, 1986). Um teste com alta validade de predição torna-o viável para fornecer um prognóstico, ou para prever, por exemplo, um comportamento futuro (VAN DER STAAY, 2006). Um modelo animal processa validade de predição se ele permite a extrapolação do efeito de uma manipulação experimental particular, a partir de uma espécie para outra espécie, incluindo humanos (VAN DER STAAY, 2006).

Validade etiológica: através da qual se garante que a etiologia de determinado fenômeno no modelo animal e no homem sejam semelhantes; quando a validade etiológica é estabelecida, o modelo pode tornar-se extremamente útil no desenvolvimento de tratamentos (BLOOM & KUPFER, 1995);

Validade de expressão: refere-se à similaridade entre o comportamento exibido pelo animal no modelo e os sinais na condição humana, tais como liberação de corticoesterona, perda de apetite e defecação, em repostas à situações ameaçadoras ou a perigos iminentes (MOSIER, 1947).

O labirinto em cruz elevado (LCE) é uma ferramenta útil para o estudo experimental da ansiedade em roedores (PELLOW *et al.*, 1985), bem como para revelar ou reconhecer drogas com potencial ansiolítico (HOGG, 1996). O LCE é baseado no comportamento exploratório de roedores (LISTER, 1990) e leva em consideração o medo natural, apresentado por esses animais, de lugares abertos e elevados (MONTGOMERY, 1955). É rápido, simples e de baixo custo, além de não utilizar

choques elétricos ou privação de água/alimento como estímulo aversivo, vale-se de estímulos incondicionados de medo como a novidade e os espaços abertos do LCE (PELLOW *et al.*, 1985; RODGERS *et al.*, 1997).

Em 1955, Montgomery realizou uma série de experimentos, utilizando um labirinto em Y elevado, composto por três compartimentos (um fechado e dois abertos), através do qual era possível estudar a relação entre o comportamento exploratório e o medo em roedores. Posteriormente, Handley & Mithani (1984) acrescentaram um quarto braço ao labirinto em Y utilizado anteriormente por Montgomery, tornando-o simétrico em forma de cruz, criando, assim, o LCE. No LCE, o campo exploratório do animal é caracterizado por quatro braços elevados em forma de cruz, com dois braços opostos abertos (espaços não protegidos) e dois outros braços opostos fechados (espaços protegidos por paredes laterais) (HANDELY & MITHANI, 1984). O comportamento animal é induzido por curiosidade, conduzido por um conflito entre a tendência para explorar o novo ambiente e, simultaneamente, evitar a exploração produzida pelo medo dos desconhecido. Esse conflito tem sido considerado análogo à ansiedade em humanos (GRAY, 1982), sendo suprimido e aumentado por drogas ansiolíticas e ansiogênicas, respectivamente (PELLOW *et al.*, 1985).

Durante a exploração do LCE, o animal evita explorar os braços abertos, preferindo explorar os braços fechados, exibindo baixa porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos (PELLOW *et al.*, 1985). Na literatura, o fato de os animais evitarem os braços abertos do labirinto tem sido atribuído ao medo, induzido pela ausência de superfícies verticais, que impede o comportamento tigmotático dos animais e, conseqüentemente, reduz a exploração nesse tipo de braço. Outro aspecto que pode influenciar o comportamento exploratório de ratos no LCE é o fato de existir

uma diferença de luminosidade entre os braços abertos e fechados, notando-se, assim, uma tendência dos animais para explorar as áreas menos iluminadas do labirinto, representadas pelos braços fechados (PEREIRA *et al.*, 2005). A tigmotaxia representa a exploração tátil do ambiente através das vibrissas em roedores, um comportamento natural que induz o animal a manter-se em contato com superfícies verticais, o que diminui as chances de encontro com predadores (por manter-se em um ambiente mais protegido), funcionando, assim, como uma estratégia de defesa (TREIT & FUNDYTUS, 1988).

Entretanto, Cardenas, Lamprea & Morato (2001) observaram que ratos que tiveram suas vibrissas totalmente removidas e foram expostos ao LCE com luminosidade baixa ou normal apresentaram a mesma porcentagem e tempo de permanência nos braços abertos em relação aos animais que tinham suas vibrissas intactas. No entanto, essas duas variáveis demonstraram maior índice nos animais expostos ao LCE com baixa luminosidade, em comparação com seu respectivo grupo (vibrissa intacta ou removida) exposto ao LCE normal. Dessa forma, percebe-se que há um misto na influência da tigmotaxia e da luminosidade no comportamento dos roedores no teste do labirinto em cruz elevado e, tanto o primeiro quanto o segundo fator tendem a levar o animal a apresentar uma preferência pelos braços fechados do labirinto.

A influência do nível de iluminação na performance dos animais no LCE vem sendo estudada há mais de 10 anos. Devido ao fato de o animal ser dotado de habilidade para discriminar áreas no LCE com mais ou menos luminosidade, conduz, então, sua exploração em áreas com baixas propriedades indutoras de medo, estabelecendo, assim, a preferência pelos braços menos iluminados (braços fechados),

(PEREIRA *et al.*, 2005). Morato & Castrechini (1989) determinaram os efeitos da superfície do assoalho (tela metálica, VM+, ou madeira lisa, VM-) e a intensidade de luz ambiental sobre a atividade exploratória de ratos no labirinto em cruz elevado usando quinze animais em cada grupo. Assim, ratos que foram testados no assoalho metálico sobre baixa intensidade de luz ambiental apresentaram aumento no número total de entradas nos braços comparados com VM+/alta luz, VM-/alta luz ou VM-/baixa luz. A frequência relativa de entradas nos braços abertos foi maior sobre VM+/baixa luz em comparação a VM-/baixa luz, VM+/alta luz e VM-/alta luz, respectivamente, bem como para a variável porcentagem de tempo gasto nos braços abertos. O presente estudo demonstrou que os valores basais para estudo de drogas pode ser diminuída ou aumentada pela seleção de tipos de superfícies do assoalho e intensidade da iluminação ambiental, desse modo permitindo maior sensibilidade, e assim seletividade, para mensuração dos efeitos de drogas ansiolíticas e ansiogênicas respectivamente. Falter, Gower & Gobert (1992) investigaram os fatores que poderiam influenciar o comportamento exploratório de ratos machos da linhagem Sprague-Dawley no labirinto em cruz elevado em duas séries de experimentos. A primeira parte com fatores relacionados ao teste no aparato: nível de luz, configurações espaciais e altura do labirinto. A segunda parte com fatores propositados para modificar a condição interna dos animais através de tratamentos com estresse total: imersão parcial em água, imobilização forçada por 10 ou 20 minutos, shock elétrico ou 20 minutos de pré-exposição para os braços abertos e fechados. Chlordiazepoxide, 5mg/kg por via intraperitoneal (i.p.) foi administrado como a droga referência, e aumentou de forma significativa à exploração dos braços abertos em todos, porém em um dos experimentos. Em animais tratados com salina, nenhum efeito para o ambiente ou

tratamento foram detectados. Essa resistência para manipulações exógenas sugerem que a ansiedade no labirinto em cruz elevado deverá ser considerada como uma resposta situacional limite, característica de roedores permanecerem nessa situação particular. Jones & King (2001) investigaram os efeitos de testes animais durante as fases claras e escuras, em claridade e em condições teste de escuridão subjetiva, sobre o comportamento basal em modelos animais de ansiedade. Ratos Sprague-Dawley foram expostos a uma bateria de testes incondicionados, testes exploratórios (labirinto em cruz elevado, arena de campo aberto, holeboard) e um novo modelo de ansiedade extrema um labirinto em cruz elevado instável. O referido estudo demonstrou que a fase circadiana do teste falhou por alterar consistentemente o comportamento em todos os modelos. O nível de iluminação teste, não teve efeito sobre a resposta dos sujeitos para a arena de campo aberto, holeboard e labirinto em cruz elevado instável. O teste escuro aumentou a atividade locomotora no LCE (número total de entradas, entradas nos braços fechados e distância percorrida) sem diminuir a esquia para os braços abertos. Assim, a construção da ansiedade como mensurada por um número de diferentes paradigmas resistiu a maior manipulação intra-laboratório da fase circadiana do teste e iluminação do aparato. É sugerido que o efeito da ritimicidade circadiana pode ser confinada por perfis comportamentais de ligantes serotoninérgicos, particularmente os 5-HT 1A no LCE. Bertoglio & Carobrez em 2002, realizaram um estudo no qual os animais foram expostos a diferentes condições de iluminação e também em diferentes fases do ciclo circadiano noturno/diurno. Os autores sugerem que a exploração do LCE por roedores é dependente do ciclo circadiano e que isto pode ser uma possível origem da variabilidade do comportamento dos animais no modelo. Griebel e colaboradores (1993) verificaram que ratos expostos à alta

luminosidade exibiram menor exploração dos braços abertos e, por outro lado, expostos ao LCE com baixa luminosidade, não alteraram significativamente seus comportamentos. Becker & Grecksch (1996) realizaram um estudo onde ratos foram testados no LCE sob três diferentes níveis de iluminação (30, 300 e 900 lux). Os autores concluíram que a iluminação não alterou a porcentagem de tempo gasto nos braços fechados, número de entrada nos braços fechados, ou o tempo gasto nos braços abertos ou no total de entradas, sugerindo que o comportamento do rato no LCE é independente do nível de iluminação durante o teste. Entretanto, o *set-up* experimental especificou o mesmo nível de luminosidade em ambos os braços; abertos e fechados, com nenhuma diferença de luminosidade entre os dois tipos de braços. Assim, pode ser mostrado que o comportamento animal não altera em decorrência da ausência de gradientes de luminosidade entre os braços abertos e fechados.

Recentemente, Garcia, Cardenas & Morato (2005) estudaram o limiar de intensidade de luz para o disparo da aversão nos braços abertos no LCE. Os autores concluíram que o comportamento exploratório nos braços abertos (entradas e tempo gasto nos braços abertos) foi mais intenso em baixos níveis de iluminação (0 e 1 Lux), quando comparados aos outros níveis de iluminação (3, 10, 30, 100 e 300 lux). Por outro lado, o comportamento locomotor (como indicado pela frequência de entradas e distância percorrida nos braços fechados) não foi alterado nas condições de iluminação estudadas. Os autores concluíram, assim, que a visão é um sentido importante no disparo da aversão dos braços abertos no LCE.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa¹ demonstrou que o nível de luminosidade relativa entre os braços abertos e fechados do LCE também é uma variável importante na determinação da preferência pelos braços fechados. Demonstrou-se que quanto maior a diferença de luminosidade entre os braços abertos e fechados do labirinto, maior tende a ser a preferência em explorar os braços menos iluminados do LCE, ou seja, os braços fechados. Em contraste, quanto menor a diferença de luminosidade entre os braços abertos e fechados do labirinto, maior a dificuldade do animal em discriminar áreas com maior ou menor luminosidade, levando à redução do conflito e ao aumento da exploração nos braços abertos (PEREIRA *et al.*, 2005). Concluiu-se, então, que os animais evitam explorar não só espaços abertos, mas também aqueles mais iluminados do LCE, sendo a diferença de luminosidade relativa entre os braços abertos e fechados do LCE uma variável importante na determinação da preferência pelos braços fechados (PEREIRA *et al.*, 2005).

A demonstração da importância de estímulos visuais no estabelecimento da preferência pelos braços fechados gerou um problema significativo para a validade de predição do LCE. Primeiramente, porque nas configurações de LCE normalmente utilizadas na literatura (sejam as paredes dos braços fechados construídas de madeira, polietileno opaco ou vidro fumê), o nível de luminosidade dos braços fechados é sempre menor que aquele apresentado nos braços abertos. Esse fato impede o pesquisador de inferir se o animal prefere os braços fechados porque esses possuem proteção lateral ou porque são menos iluminados. Em segundo lugar, um efeito prejudicial de uma determinada droga sobre a discriminação visual do animal poderia

¹ Grupo de pesquisa do Laboratório de Estudos da Psicobiologia da Ansiedade em Roedores do Centro de Ciências Biológicas – CCB da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

ser confundido com um efeito ansiolítico clássico (como o apresentado pelo benzodiazepínico Midazolam (MDZ)), resultante da diminuição do nível de medo do animal. Desse modo, seria importante avaliar uma configuração alternativa do LCE, com diferentes níveis de luminosidade entre as suas regiões protegidas por paredes laterais, excluindo-se assim a tigmotaxia, ou seja, haverá apenas uma mudança no material de confecção das paredes dos braços fechados do LCE, e assim, o comportamento tigmotáxico estaria presente em todos os materiais de confecção das paredes dos braços fechados do LCE. Um LCE com tal configuração poderia ser útil na medida em que permitiria avaliar não só a preferência pelos braços abertos ou fechados (efeito ansiolítico ou ansiogênico), mas, também, a preferência pelo braço fechado com menos luminosidade, o que seria indicativo de discriminação visual do animal. Além disso, uma configuração alternativa de LCE que permitisse avaliar a discriminação visual do animal de forma independente da tigmotaxia permitiria dissociar efeitos ansiolíticos de efeitos prejudiciais sobre o sistema visual do animal.

Assim, a possibilidade de se dissociar no LCE o efeito ansiolítico, ou seja, redução do medo, o que leva a um aumento na exploração dos braços abertos, de prejuízo na discriminação visual merece maiores estudos, pois poderá levar a um fortalecimento da validade de predição do modelo.

Visto que o córtex visual e a retina dos animais exibem receptores muscarínicos (NOBILI & SANNITA, 1997) e que o bloqueio desses receptores afeta a discriminação visual dos animais, utilizaremos neste estudo a Escopolamina (ESC), droga antagonista dos receptores muscarínicos da acetilcolina, como controle positivo, para a avaliação da discriminação visual dos animais.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito da variação do nível de luminosidade entre os braços abertos e fechados (**A/F Δ lux**) e entre os braços fechados (**F/F Δ lux**) do LCE no comportamento exploratório de ratos, bem como as implicações sobre a validade de predição do modelo.

2.2 Específicos

- ✓ Verificar se alterações no A/F Δ lux poderiam prejudicar a detecção de drogas ansiolíticas.
- ✓ Verificar se a incorporação de um F/F Δ lux poderia permitir ao LCE a avaliação da discriminação visual do animal.
- ✓ Verificar se alterações no F/F Δ lux poderia alterar a preferência dos animais pelos braços fechados do LCE.
- ✓ Verificar se o estabelecimento de um F/F Δ lux poderia prejudicar a detecção de uma droga ansiolítica clássica (Midazolam).
- ✓ Verificar se a inclusão de um F/F Δ lux poderia habilitar o LCE para identificar drogas indutoras de prejuízo da discriminação visual do animal.
- ✓ Verificar se um efeito ansiolítico induzido pelo Midazolam, poderia ser confundido com um efeito na discriminação visual do animal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos Wistar machos (Fig.1) pesando entre 250 e 300g, foram utilizados como sujeitos experimentais. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Previamente aos experimentos, os animais foram submetidos a sete dias de adaptação ao biotério do Laboratório de Neurobiologia (CFS), em grupos de 5 animais por caixa de polipropileno (49 x 34 x 16 cm) forradas com maravalha, com livre acesso à água e à ração padrão. A temperatura foi mantida em $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com um ciclo claro/escuro de 12 horas (com as luzes acendendo às 06 horas e apagando às 18 horas). Os animais foram manipulados apenas para limpeza das caixas (a cada 48 horas), pesagem e administração de drogas. Os experimentos foram realizados no período vespertino (das 13 horas às 17 horas) com o observador fora da sala de experimentação. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa em Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA), sob os números 361/CEUA e 23080. 015267/2005-77/UFSC.



Figura 1: Rato Wistar.

Fonte: Foto do pesquisador.

3.2 Drogas

Para os experimentos foram utilizados Midazolam (Dormonid ® ; Roche) agonista dos receptores benzodiazepínicos no complexo do receptor GABA_A e Escopolamina (*N-Butilbrometo de Escopolamina*, antagonista de receptores muscarínicos), obtida da *Tocris Cookson Inc* (EUA). As drogas foram diluídas em salina (0,9%) e administradas por via intraperitoneal (i.p.) na relação 0,15 ml da solução para cada 100 g de peso do animal.

3.3 O labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto é constituído de duas passarelas de madeira, dispostas perpendicularmente, formando uma cruz simétrica (quatro braços de 50 cm de comprimento por 10 cm de largura). Dois braços opostos são fechados por laterais de 40 cm de altura, enquanto os braços restantes são abertos e circundados apenas por uma borda de 1 cm de acrílico transparente, para reduzir a ocorrência de quedas dos animais. Na junção entre os braços, delimita-se uma área central de 10 x 10cm². O labirinto como um todo é elevado 50 cm do solo. Quatro lâmpadas fluorescentes (15W cada), dispostas igualmente em forma de cruz, 100 cm acima do labirinto, foram utilizadas como única fonte de iluminação do experimento (Figs. 2 e 3).

Cada sessão teve início com a colocação do animal no centro do labirinto, com a face voltada para um dos braços fechados. Foi permitido ao animal explorar livremente o labirinto por 5 minutos. Cada sessão foi filmada em VHS e, posteriormente, reproduzida para quantificação das variáveis espaciais temporais com o auxílio do Programa Etholog 2.25 (OTTONI, 2000). Tais variáveis espaciais temporais foram representadas pelo número de entradas nos braços abertos (EA), percentagem de entradas nos braços abertos (%EA), percentagem de tempo de permanência nos braços abertos (%TA); percentagem de entradas no braço fechado mais claro (%EBFC), percentagem de tempo de permanência no braço fechado mais claro (%TBFC) e número de entradas nos braços fechados (EF) (PELLOW *et al.*, 1985). A variável %EA foi calculada através da fórmula $(EA/EF) \times 100$. A variável %TA foi calculada através da fórmula $(TA/TT) \times 100$, sendo TA o tempo de permanência nos

braços abertos e TT o tempo total de cada sessão (5 minutos). As variáveis %EBFC e %TBFC foram calculadas da seguinte forma: $(EBFC/EF) \times 100$ e $(TBFC/TOTBF) \times 100$, onde TOTBF representa o tempo total de braço fechado. Entende-se por braço fechado mais claro (BFC) o braço fechado mais iluminado do LCE e TBFC o tempo total de permanência no braço fechado mais claro (mais iluminado). Mediante o fato da preferência de roedores para espaços fechados e escuros, justifica-se a adoção pelas variáveis %EBFC e %TBFC para a avaliação da discriminação visual dos animais.

O critério de definição para a entrada e saída de um braço do labirinto foi a colocação das quatro patas do animal dentro e fora do mesmo, respectivamente. Com a finalidade de evitar pistas odoríferas, após cada teste o labirinto foi limpo com tecido umedecido em uma solução de álcool a 20%. A eventual queda de um animal do labirinto implicou necessariamente na sua exclusão.

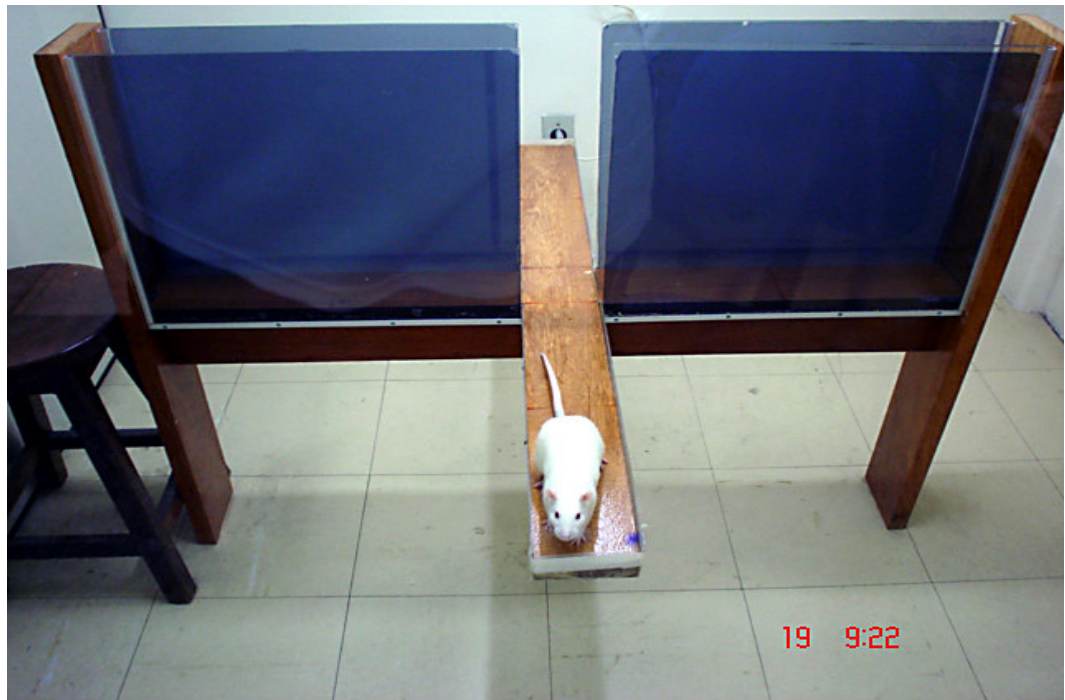


Figura 2: Labirinto em Cruz Elevado (LCE).
Fonte: Foto do pesquisador.



Figura 3: Sala de experimentação e iluminação.
Fonte: Foto do pesquisador.

Quatro configurações do LCE foram estabelecidas (Fig.4, A, B, C e D). A tabela 2 mostra os níveis de luminosidade em diferentes configurações dos braços fechados do LCE.

- a) LCE com dois braços fechados por paredes laterais de vidro revestido externamente com película fumê ($F/F\Delta lux=8$) (fig. 4A);
- b) LCE com dois braços fechados por paredes laterais de vidro transparente ($F/F\Delta lux = 10$) (fig. 4B);
- c) LCE com um braço fechado circundado por paredes laterais de vidro com película fumê e o outro braço fechado circundado por paredes laterais de vidro transparente ($F/F\Delta lux = 41$) (fig. 4C);
- d) LCE com um braço fechado circundado por paredes laterais de vidro com película fumê, e o outro braço fechado circundado por paredes laterais de madeira ($F/F\Delta lux = 85$) (fig. 4D).



A



B



C



D

Figura 4: Configurações de LCEs utilizadas nos experimentos.

A: LCE 8 lux.

B: LCE 10 lux.

C: LCE 41 lux.

D: LCE 85 lux

Fonte: Foto do pesquisador.

NÍVEL DE LUMINOSIDADE EM DIFERENTES CONFIGURAÇÕES DE LCE

	BFC	BFE	BA	QC	A/F Δ lux	F/F Δ lux
LCEfumê/fumê	288	280	372,5	434	89	8
LCEvidro/vidro	372	362	362	457	8	10
LCEfumê/vidro	257,5	216,5	295,25	341	58	41
LCEfumê/madeira	212,5	127,5	286,75	324	117	85

Tabela 2: Níveis de luminosidade em diferentes configurações dos braços fechados do LCE. São apresentados os níveis de LUX nos diversos ambientes do LCE e, também, o gradiente entre esses valores nos quatro tipos de braço. BFC indica braço fechado claro; BFE: braço fechado escuro; BA: braço aberto; QC: quadrante central.

Mediante as configurações de LCEs mencionadas acima, as diferenças de luminosidade entre os braços fechados ($F/F\Delta\text{lux}$) e entre os braços abertos e fechados ($A/F\Delta\text{lux}$) foram medidas na sala de experimentos com o auxílio do aparelho luxímetro Digital MLM-1010 Minipa® Indústria e Comércio LTDA. A tabela 2 mostra os níveis de luminosidade em diferentes configurações dos braços fechados do LCE.

3.4 Procedimentos

3.4.1 Experimento 1

O objetivo do experimento 1 foi verificar se alterações no $A/F\Delta\text{lux}$ poderiam prejudicar a detecção de drogas ansiolíticas.

Os animais receberam, por via intraperitoneal (i.p.). tratamento com salina (0,9%) ou Midazolam (Dormonid ® ; Roche) (1,0 mg/kg), trinta minutos antes de serem submetidos aos LCEs, conforme descrito no item 3.3. As configurações de LCEs utilizadas foram: $A/F\Delta\text{lux}= 8 \text{ lux}$ e $A/F\Delta\text{lux}= 89 \text{ lux}$, visto que possuem $F/F\Delta\text{lux}$ equivalentes. Os seguintes grupos experimentais foram, então, formados:

- a) GRUPO CONTROLE (SALINA): **$A/F=\Delta 89 \text{ lux}$** (n=16) e **$A/F=\Delta 8 \text{ lux}$** (n=20);
- b) GRUPO MIDAZOLAM 1,0 mg/kg: **$A/F=\Delta 89 \text{ lux}$** (n=22) e **$A/F=\Delta 8 \text{ lux}$** (n=17).

3.4.2 Experimento 2

Os objetivos do experimento dois foram:

1. Verificar se a incorporação de um $F/F\Delta lux$ poderia alterar a preferência dos animais pelos braços fechados do LCE.
2. Verificar se a incorporação de um $F/F\Delta lux$ poderia permitir ao LCE a avaliação da discriminação visual do animal.

Ratos controle (salina 0,9%) foram submetidos à exploração livre de LCEs com os seguintes $F/F\Delta lux$, conforme descrito no item 3.3.

- a) $F/F\Delta lux = 8$ (n=19);
- b) $F/F\Delta lux = 41$ (n=15);
- c) $F/F\Delta lux = 85$ (n=16).

3.4.3 Experimento 3

O experimento 3 teve como propósito:

1. Verificar se o estabelecimento de um $F/F\Delta lux$ poderia prejudicar a detecção de uma droga ansiolítica clássica (Midazolam).
2. Verificar se a inclusão de um $F/F\Delta lux$ poderia habilitar o LCE para identificar drogas indutores de prejuízo da discriminação visual do animal.

3. Verificar se um efeito ansiolítico induzido pelo Midazolam poderia ser confundido com um efeito prejudicial da droga sobre a discriminação visual do animal.

Os animais receberam tratamento por via intraperitoneal (i.p.) tratamento com salina (0,9%), com MDZ (1,0 mg/kg) ou ESC (1,0; 2,0 e 8,0 mg/kg), trinta minutos antes de serem submetidos aos LCEs. Conforme descrito no item 3.3, os LCEs possuíam $F/F\Delta lux$ de 41 e 85 lux, constituindo-se assim, os seguintes grupos experimentais:

- a) **LCE $F/F\Delta lux = 41$:** salina (n=15), MDZ 1,0 mg/kg (n=15), ESC 1,0 mg/kg (n=11), ESC 2,0 mg/kg (n=19) e ESC 8,0 mg/kg (n=12).
- b) **LCE $F/F\Delta lux = 85$:** salina (n=16), MDZ 1,0 mg/kg (n=12), ESC 1,0 mg/kg (n=14), ESC 2,0 mg/kg (n=16) e ESC 8,0 mg/kg (n=14).

Vale ressaltar que o número total (N total) da amostra de animais utilizadas nos experimentos foi de 269 animais.

3.5 Análise estatística

Os dados relativos aos experimentos 1 e 3 foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias (Fator 1: tratamento com droga e Fator 2: $A/F\Delta lux$ e $F/F\Delta lux$). Já no experimento 2, os dados foram analisados por ANOVA de uma via.

As análises de variância (de uma ou duas vias) foram seguidas do Teste de Duncan para múltiplas comparações, quando necessário. Apenas valores de probabilidade menores que 5% foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1: Influência das alterações na A/FΔLux na detecção de drogas ansiolíticas no LCE

A tabela 3 apresenta o resultado geral da ANOVA em ratos que foram submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado com F/FΔlux= 8 e 10 lux, após a administração por via intraperitoneal (i.p.) de salina (0,9%) e Midazolam (1,0 mg/kg), Tais configurações de LCE, apresentam A/FΔlux de 89 e 8 lux, respectivamente. A figura 5 apresenta a percentagem de entrada (5A) e o tempo de permanência nos braços abertos (5B); a figura 6 representa o número de entradas nos braços abertos (6A) e número de entradas nos braços fechados (6B). O teste de Duncan indicou diferenças significativas ($p < 0,05$) na percentagem de entradas nos braços abertos e na percentagem de tempo de permanência nos braços abertos, bem como no número de entradas nos braços abertos, nos grupos tratados com Midazolam e testados no LCE A/FΔlux= 89, em relação ao respectivo grupo tratado com salina (0,9%). O teste de Duncan não indicou diferença significativa no número de entradas nos braços fechados em ambos os labirintos (fig. 6B).

Tabela 3

Resultados da ANOVA de duas vias, indicando os efeitos principais e interações no Experimento 1

Variáveis comportamentais	Droga	LCE	Droga X LCE
% entrada nos braços abertos	$F_{1,71} = 5,81$; $p < 0,05$	$F_{1,71} = 0,80$, NS	$F_{1,71} = 1,01$; NS
% tempo nos braços abertos	$F_{1,71} = 6,61$; $p < 0,05$	$F_{1,71} = 0,03$; NS	$F_{1,71} = 0,47$; NS
Entradas braços abertos	$F_{1,71} = 7,32$ $p < 0,05$	$F_{1,71} = 2,25$; NS	$F_{1,71} = 0,08$; NS
Entradas braços fechados	$F_{1,71} = 0,07$; NS	$F_{1,71} = 3,45$; NS	$F_{1,71} = 0,00$; NS

Os ratos foram testados nas configurações de LCE A/F Δ lux= 89 e 8 lux, após 30 minutos da administração de salina (0,9%) e Midazolam (1,0 mg/kg). NS indica valores de F não significativos.

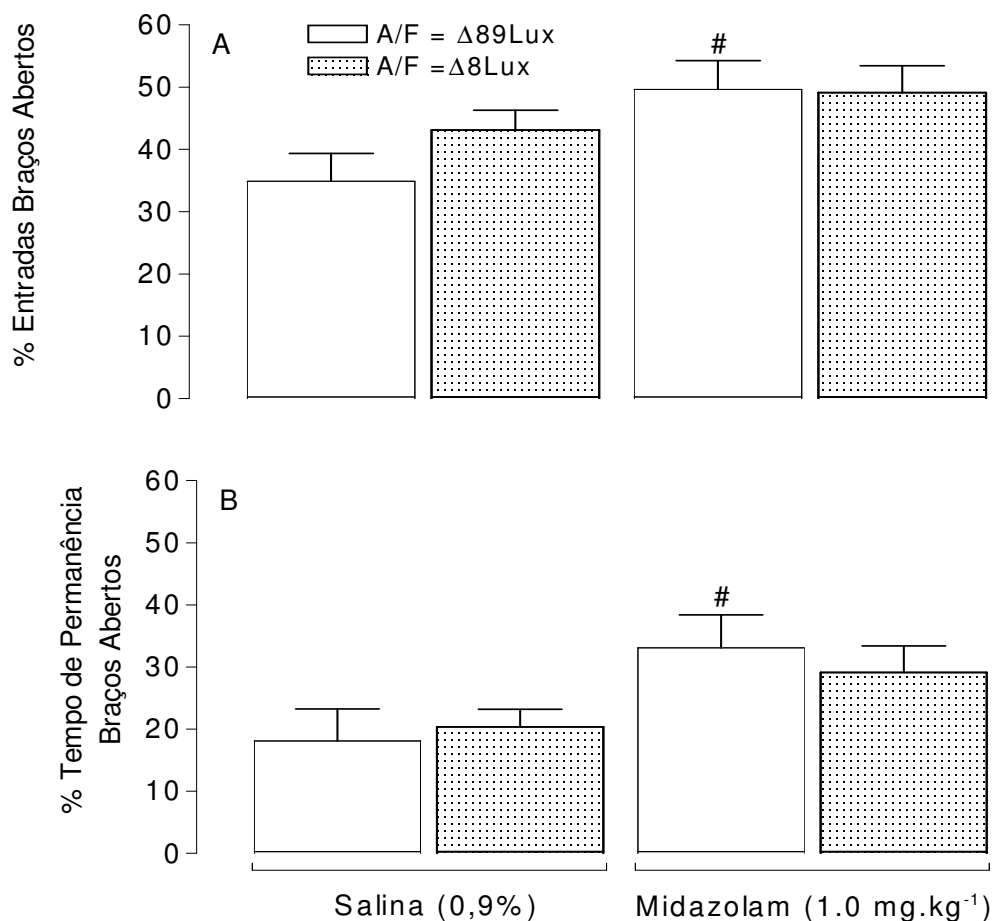


Figura 5. Porcentagem de entrada (A) e de tempo de permanência nos braços abertos (B), de ratos tratados com salina 0,9% e Midazolam 1,0mg/kg e submetidos a configurações de LCE com diferentes F/F Δ luxs. Os animais foram expostos aos LCEs com A/F=Δ89 lux e A/F=Δ8 lux, 30 minutos após a administração, i.p., das drogas. Os dados representam à média \pm EPM, # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com salina (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

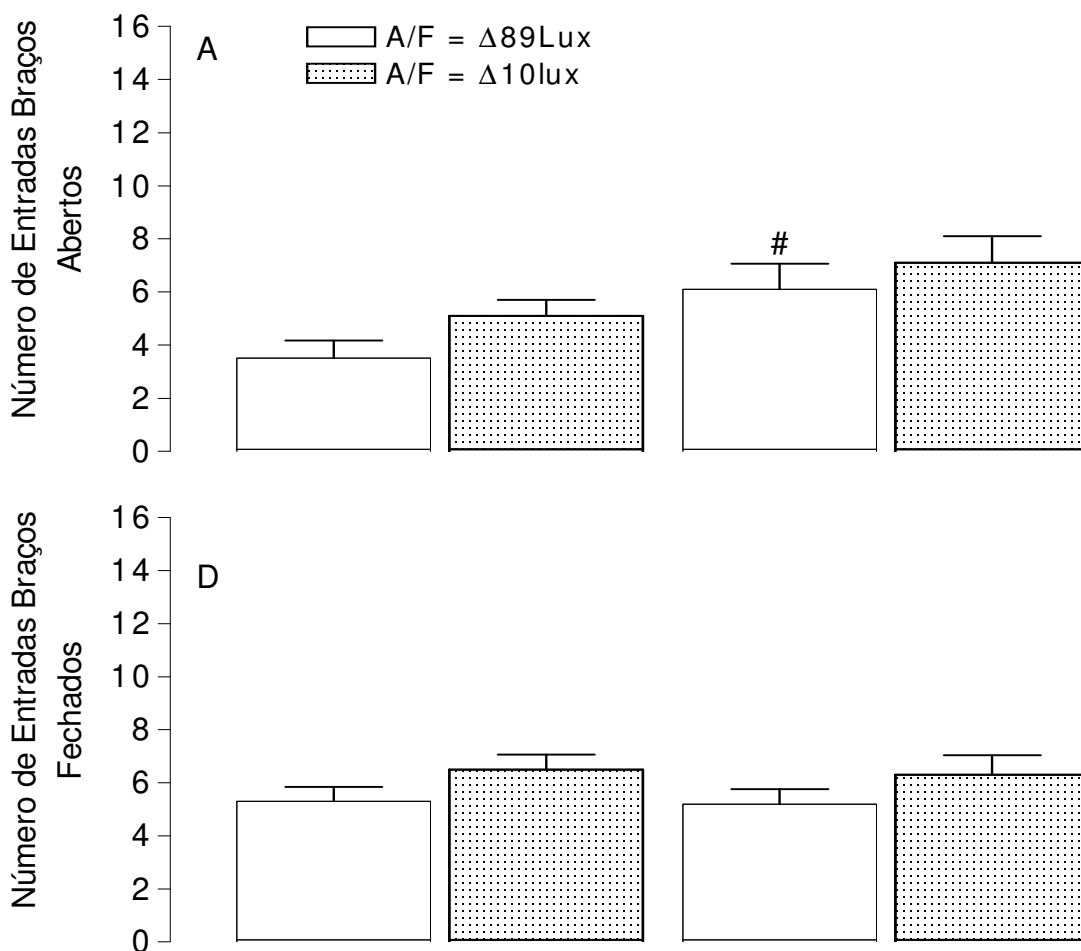


Figura 6. Número de entradas nos braços abertos (A) e número de entradas nos braços fechados (B), de ratos tratados com salina 0,9% e Midazolam 1,0mg/kg e submetidos a configurações de LCE com diferentes F/F Δ luxs. Os animais foram expostos aos LCEs com A/F= Δ 89 lux e A/F= Δ 8 lux 30 minutos após a administração, i.p., das drogas. Os dados representam a média \pm EPM, # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com salina (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

4.2. Experimento 2: Influência do F/F Δ lux na preferência dos animais pelos braços fechados do LCE; e sobre a avaliação da discriminação visual do animal no LCE.

A tabela 4 apresenta o resultado geral da ANOVA em ratos que foram submetidos a configurações de LCE com diferentes F/F Δ lux (8, 41 e 85 lux), após a administração de salina (0,9%). A figura 7 apresenta a porcentagem de entradas (7A), tempo de permanência nos braços abertos (7B), número de entradas nos braços abertos (7C), número de entradas nos braços fechados (7D), bem como as porcentagens de entradas (7E) e de tempo de permanência no braço fechado mais iluminado (7F). O teste de Duncan indicou diminuição ($p < 0,05$) significativa nas porcentagens de entradas (7E) e de tempo de permanência no braço fechado mais claro (7F) nos LCEs com F/F Δ lux de 41 e 85 Lux, em relação ao LCE com F/F Δ lux = 8 Lux. Não houve alteração significativa nas demais variáveis analisadas.

Tabela 4

Resultados da ANOVA de uma via, indicando os efeitos principais e interações no Experimento 2.

Variáveis comportamentais	LCE
% entrada nos braços abertos	$F_{2,47} = 1,87$; NS
% tempo nos braços abertos	$F_{2,47} = 2,23$; NS
Entradas braços abertos	$F_{2,47} = 0,47$; NS
Entradas braços fechados	$F_{2,47} = 0,12$; NS
% entrada no braço fechado mais iluminado	$F_{2,47} = 4,78$; $p < 0,05$
% tempo no braço fechado mais iluminado	$F_{2,47} = 10,79$; $p < 0,05$

Os ratos foram submetidos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado, com diferenças de luminosidade entre os braços fechados ($\Delta F/F$) 8, 41 e 85 Lux; NS indica valores de F não significativos.

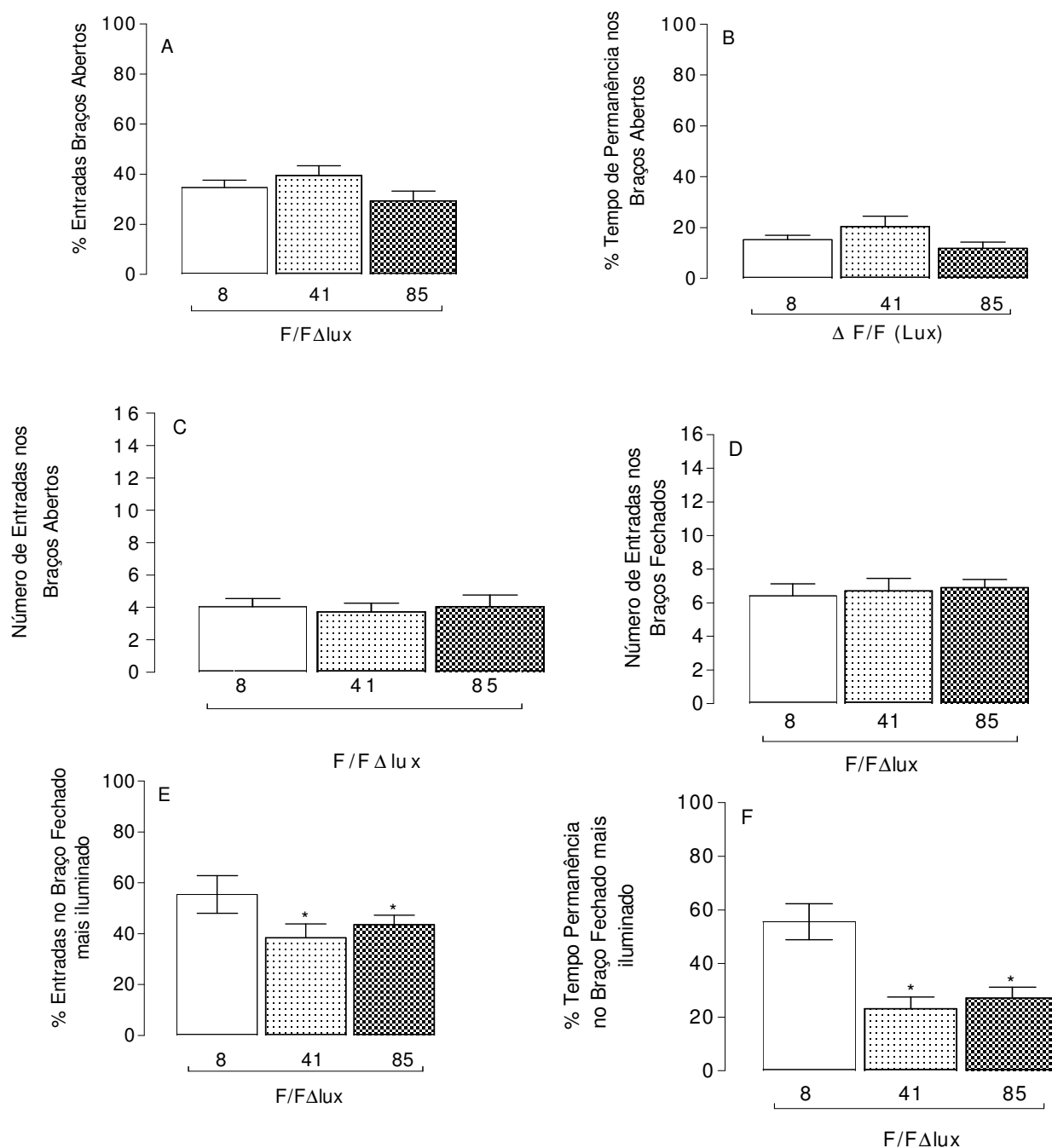


Figura 7. Porcentagem de entrada nos braços abertos (A), de tempo de permanência nos braços abertos (B), número de entradas nos braços abertos (C), número de entradas nos braços fechados (D), porcentagem de entradas no braço fechado mais iluminado (E) e porcentagem de tempo de permanência no braço fechado mais iluminado (F) de ratos que foram tratados com salina 0,9% e após 30 minutos, foram submetidos a configurações de LCE, com F/FΔlux 8,41 e 85 lux. Os dados representam a média ± EPM, * p<0,05 em relação ao LCE com F/FΔlux de 8 lux (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

4.3. Experimento 3: Influência do F/F Δ Lux na detecção de drogas ansiolíticas e em drogas indutoras de prejuízo na discriminação visual do animal no LCE

A tabela 5 apresenta o resultado geral da ANOVA em ratos que foram tratados com salina (0,9%), Midazolam (1,0 mg/kg) ou Escopolamina (1,0, 2,0 e 8,0 mg/kg) e submetidos a configurações de LCEs com diferentes F/F Δ lux (41 e 85 lux). A figura 8 apresenta as porcentagens de entradas (8A) e de tempo de permanência nos braços abertos (8B). A figura 9 apresenta o número de entradas nos braços abertos (9A) e o número de entradas nos braços fechados (9B). A figura 10 apresenta as porcentagens de entradas no braço fechado mais iluminado (10A) e as porcentagens de tempo de permanência neste mesmo braço (10B). O teste de Duncan indicou aumento significativo ($p < 0,05$) na porcentagem de entradas nos braços abertos (fig. 8A) em animais tratados com Midazolam e Escopolamina (8,0 mg/kg), testados no LCE com F/F Δ lux de 85. O teste de Duncan indicou aumento significativo ($p < 0,05$) na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (fig. 8B) em animais tratados com Escopolamina nas doses de 2,0 e 8,0 mg/kg e testados nos LCEs F/F Δ lux de 41 e 85 lux.

Em relação ao número de entradas nos braços abertos (fig. 9A), houve aumento significativo ($p < 0,05$) em animais tratados com Midazolam (1,0 mg/kg) e testados nos LCEs com F/F Δ lux de 41 e 85 lux. O teste de Duncan não indicou nenhuma diferença significativa no número de entradas nos braços fechados (fig. 9B).

Em relação à porcentagem de entradas no braço fechado mais iluminado, o teste de Duncan indicou diferença significativa ($p < 0,05$) somente em animais tratados com Escopolamina 8,0 mg/kg e testados no LCE com F/F Δ lux de 41 Lux (fig. 10A).

Também houve diferença significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de tempo de permanência no braço fechado mais iluminado em animais tratados com Escopolamina (8,0 mg/kg) nos LCEs com F/F Δ lux de 41 e 85 Lux (fig. 10B).

Tabela 5

Resultados da ANOVA de duas vias, indicando os efeitos principais e interações no Experimento 3.

Variáveis comportamentais	Droga	LCE	Droga X LCE
% entrada nos braços abertos	$F_{4,134} = 3,70$; $p < 0,05$	$F_{1,134} = 5,80$; $p < 0,05$	$F_{4,134} = 1,00$; NS
% tempo nos braços abertos	$F_{4,134} = 5,89$; $p < 0,05$	$F_{1,134} = 4,16$; $p < 0,05$	$F_{4,134} = 0,24$; NS
Entradas braços abertos	$F_{4,134} = 4,88$; $p < 0,05$	$F_{1,134} = 1,14$; NS	$F_{4,134} = 1,63$; NS
Entradas braços fechados	$F_{4,134} = 4,23$; $p < 0,05$	$F_{1,134} = 1,48$; NS	$F_{4,134} = 0,70$; NS
% entrada no braço fechado mais iluminado	$F_{4,134} = 4,61$; $p < 0,05$	$F_{1,134} = 0,10$; NS	$F_{4,134} = 1,41$; NS
% tempo no braço fechado mais iluminado	$F_{4,134} = 4,32$; $p < 0,05$	$F_{1,134} = 0,00$; NS	$F_{4,134} = 1,56$; NS

Os ratos foram submetidos a configurações de LCE com F/F Δ lux de 41 e 85 lux, após 30 minutos da administração de salina (0,9%), Midazolam (1,0 mg/kg) ou Escopolamina (1,0, 2,0 e 8,0 mg/kg). NS indica valores de F não significativos.

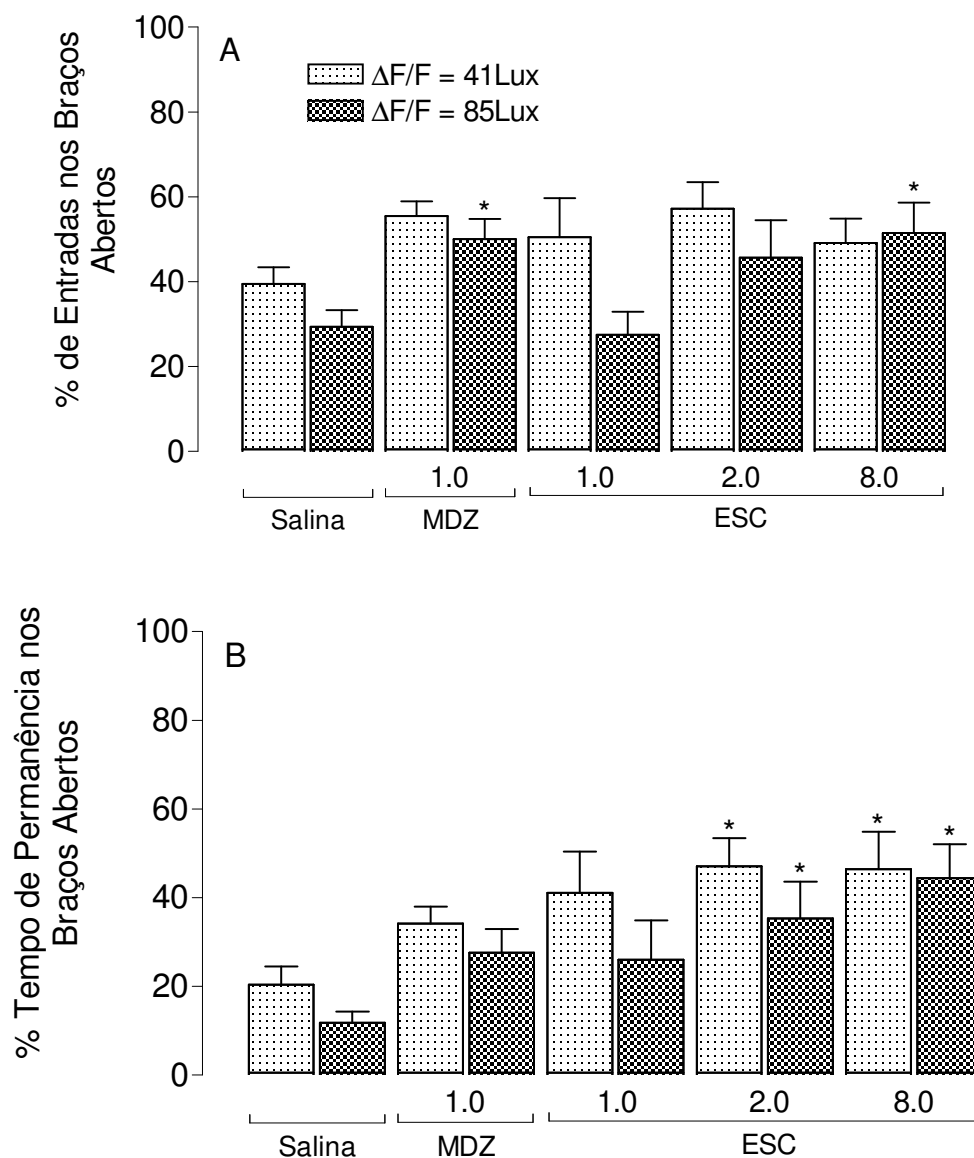


Figura 8. Porcentagem de entrada (A) e de tempo de permanência nos braços abertos (B) de ratos que foram submetidos a configurações de LCE com $F/F\Delta\text{lux}$. Os animais foram expostos aos LCEs com $F/F\Delta\text{lux}$ de 41 e 85 Lux. Os animais receberam administração i.p., de salina (0,9%), MDZ (1,0mg/kg) ou ESC (1,0, 2,0 e 8,0mg/kg), 30 minutos antes da sessão experimental. Os dados representam a média \pm EPM, * $p < 0,05$, em relação ao grupo tratado com salina (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

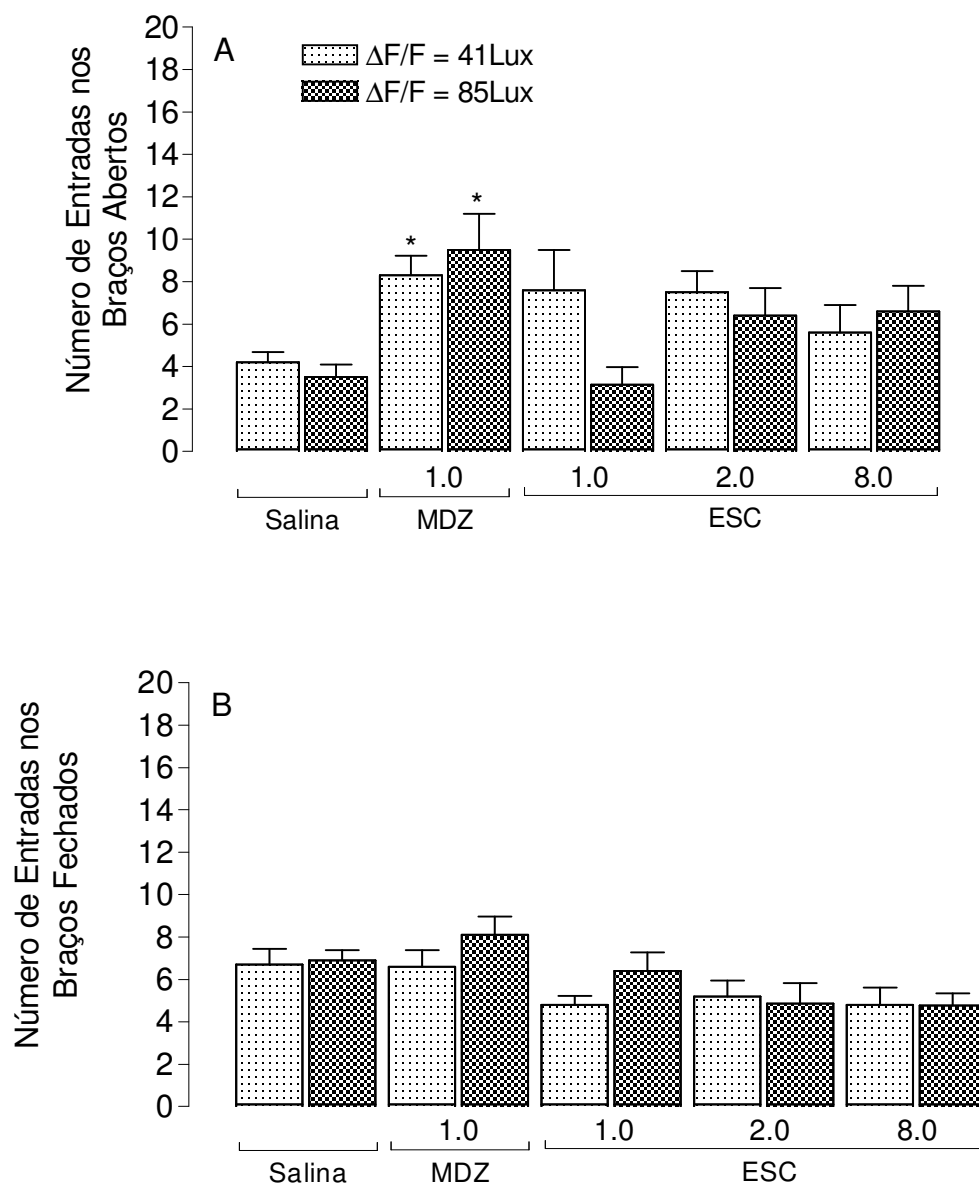


Figura 9. Número de entradas nos braços abertos (A) e número de entradas nos braços fechados (B) de ratos que foram submetidos a configurações de LCE com $F/F\Delta\text{lux}$. Os animais foram expostos aos LCEs com $F/F\Delta\text{lux}$ de 41 e 85 Lux. Os animais receberam administração i.p., de salina (0,9%), MDZ (1,0mg/kg) ou ESC (1,0, 2,0 e 8,0mg/kg), 30 minutos antes da sessão experimental. Os dados representam a média \pm EPM, * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com salina (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

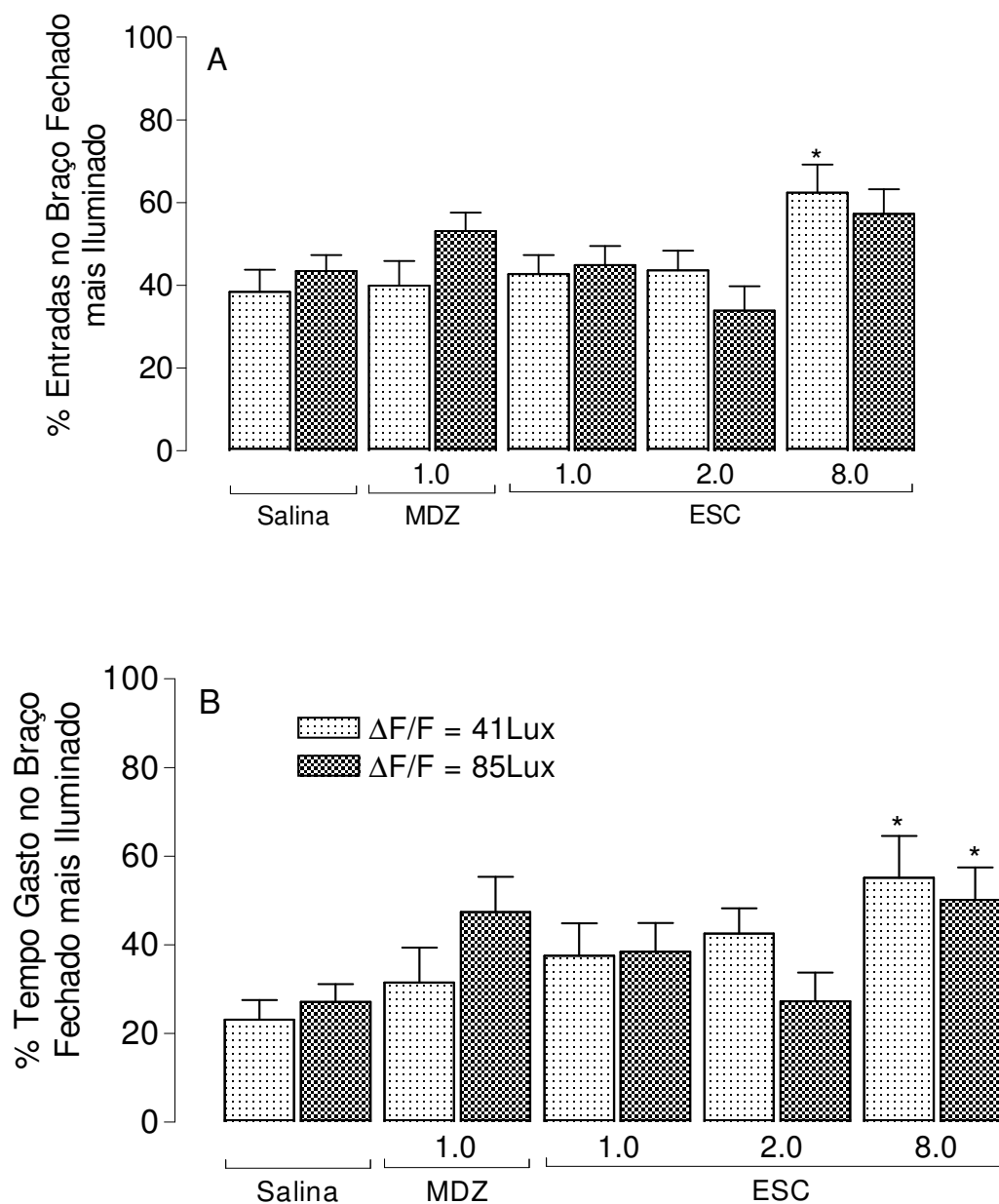


Figura 10. Porcentagem de entradas no braço fechado mais iluminado (A) e porcentagem de tempo de permanência no braço fechado mais iluminado (B) de ratos que foram submetidos a configurações de LCE com $F/F\Delta\text{lux}$. Os animais foram expostos aos LCEs com $F/F\Delta\text{lux}$ de 41 e 85 Lux. Os animais receberam administração i.p., de salina (0,9%), MDZ (1,0mg/kg) ou ESC (1,0, 2,0 e 8,0mg/kg), 30 minutos antes da sessão experimental. Os dados representam a média \pm EPM, * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com salina (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

5. DISCUSSÃO

Nas configurações do LCE normalmente utilizadas na literatura (sejam as paredes dos braços fechados construídas de madeira, polietileno opaco, vidro fumê ou vidro transparente), o nível de luminosidade dos braços fechados é via de regra menor que aquele apresentado nos braços abertos. Esse fato impede o pesquisador de inferir, com precisão, se o animal prefere os braços fechados porque esses possuem proteção lateral, permitindo a tigmotaxia, ou porque são menos iluminados. Desse modo, seria importante avaliar uma configuração alternativa do LCE, com diferentes níveis de luminosidade entre os braços fechados, visto que tal configuração de LCE poderia permitir a avaliação não só da preferência pelos braços abertos ou fechados (efeito ansiolítico ou ansiogênico), mas, também, a preferência pelo braço fechado com menos luminosidade (discriminação visual). No presente estudo, quatro configurações de LCE foram utilizadas, cada uma proporcionando um nível diferente de luminosidade sobre o quadrante central, os braços abertos e os braços fechados. Por outro lado, a alteração no tipo de material de confecção das paredes dos braços fechados altera, invariavelmente, o nível de luminosidade nos braços abertos e, conseqüentemente, do $A/F\Delta lux$.

O presente estudo demonstrou, no experimento 1, o efeito ansiolítico no LCE com $F/F\Delta lux = 8 lux$, nos animais tratados com Midazolam 1,0 mg/kg em relação ao respectivo grupo controle (salina 0,9%), o que não foi visto no LCE com $F/F\Delta lux = 10 lux$, apesar dos $F/F\Delta lux$ serem semelhantes. Esse fato pode ser explicado por estudos anteriores, mormente em Pereira *et al.* (2005), mostrando que a diferença de luminosidade relativa entre os braços abertos e fechados ($\Delta A/F$) é uma variável

importante na determinação da preferência pelos braços fechados. De fato, no LCE com $F/F\Delta lux = 10$ lux, existe um $\Delta A/F$ de 8 lux, enquanto no LCE com $F/F\Delta lux = 8$ lux existe um $A/F\Delta lux = 89$. Segundo Pereira *et al.*, (2005), quanto menor for a $\Delta A/F$, maior a dificuldade do animal em discriminar áreas com maior ou menor luminosidade, levando à redução do conflito e ao aumento da exploração nos braços abertos do labirinto. Nesse caso, um aumento na exploração dos braços abertos poderia prejudicar a detecção de drogas com potencial ansiolítico, em virtude do efeito teto (PEREIRA *et al.*, 2005). No efeito teto, em decorrência do baixo gradiente $A/F\Delta lux$, leva a alteração na linha basal do grupo controle, ou seja, aumenta a exploração nos braços abertos do LCE, chegando próximo a 50%, atingindo o teto. Desta forma, prejudica o reconhecimento por parte do LCE $A/F \Delta lux = 8$ ($F/F\Delta lux = 10$) de drogas com potencial ansiolítico. Mediante ao isso, podemos então sugerir que o LCE $F/F\Delta lux = 10$ lux não seria uma boa configuração de LCE para reconhecimento de drogas ansiolíticas, pois os níveis de luminosidade entre os braços abertos e fechados são equivalentes nesse LCE, o que leva a uma baixa diferença de luminosidade entre os braços, podendo, assim, prejudicar a detecção de drogas com potencial ansiolítico.

Já no LCE com $F/F\Delta lux = 8$ lux, houve o efeito ansiolítico clássico (aumento de exploração e permanência nos braços abertos sem alterar a exploração dos braços fechados), porém, uma vez que o $F/F\Delta lux$ é pequeno, não é possível afirmar se o efeito ansiolítico foi decorrente de redução do medo ou de prejuízo na discriminação visual do animal. Nesse sentido, seria importante avaliar uma configuração alternativa do LCE, com diferentes níveis de luminosidade entre os braços fechados, na medida em que esse processo seria útil na avaliação da preferência pelo braço fechado com menos luminosidade e, portanto, da discriminação visual. Vale ressaltar que, nesse caso, o

fator tigmotaxia estaria presente em ambos os braços fechados, com alteração apenas na luminosidade.

Assim, optou-se pela confecção de LCEs alternativos com diferenças de luminosidade entre os braços fechados ($\Delta F/F$) para se avaliar, no mesmo animal, o nível de medo e de discriminação visual. Para esse propósito, no experimento 2, ratos que receberam solução salina 0,9% foram testados no LCE convencional ($F/F\Delta\text{lux}= 8$ lux) e nos LCEs alternativos ($F/F\Delta\text{lux}= 41$ e 85 lux).

No experimento 2, observa-se que quanto maior for a $\Delta F/F$, menor a porcentagem de entradas e menor o tempo de permanência no braço fechado mais iluminado do LCE em comparação ao labirinto controle (8 lux). Portanto, nossos resultados demonstram que é possível avaliar a discriminação visual do animal dentro do ambiente representado pelos braços fechados do LCE. Nossos resultados demonstram, ademais, que variações no $\Delta F/F$ não alteram a preferência pelos braços fechados do LCE, nem a atividade locomotora do animal. Dessa forma, é possível avaliar a discriminação visual do animal sem alterar o conflito A/F .

No experimento 3, ratos que receberam solução salina (0,9%), Midazolam na dose de 1,0 mg/kg e Escopolamina nas doses de 1,0, 2,0 e 8,0 mg/kg, foram testados nos labirintos com $F/F\Delta\text{lux}= 41$ e 85 lux. Em relação ao MDZ, havia a necessidade de saber se o fato de simplesmente tornar os braços fechados do labirinto diferentes iria prejudicar a detecção do efeito ansiolítico do MDZ. Observamos no experimento 3 que o Midazolam aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos de forma significativa no LCE com $F/F\Delta\text{lux}= 85$ lux em relação ao grupo controle. MDZ também não alterou a porcentagem de tempo e a porcentagem de entradas no braço fechado mais iluminado do LCE, nem alterou a atividade locomotora

dos animais, caracterizada pelo número total de entradas nos braços fechados. Sugere-se, então, um efeito ansiolítico clássico do Midazolam em decorrência da redução do medo, sem alteração na discriminação visual do animal. De forma semelhante, no LCE com $F/F\Delta lux = 41$ lux, houve aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos e na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos, embora os dados não tenham atingido significância estatística. Entretanto, o tratamento com MDZ aumentou o número de entradas nos braços abertos, sem alterar o número de entradas nos braços fechados, o que indica efeito ansiolítico. Portanto, apesar de se ter alterado a diferença de luminosidade nos braços fechados do LCE, percebe-se que os LCEs com $F/F\Delta lux = 41$ e 85 lux reconhecem drogas ansiolíticas, desprovidas de prejuízo na discriminação visual do animal.

A Escopolamina (um antagonista de receptores muscarínicos da acetilcolina) é uma droga com a capacidade de prejudicar o sistema visual quando administrada em altas doses, seja por bloquear receptores muscarínicos na retina, seja por bloquear receptores muscarínicos no córtex visual (NOBILI & SANNITA, 1997). O experimento 3 avaliou quais doses de ESC poderiam afetar a discriminação visual dos animais, ou seja, alterar as porcentagens de entradas e de tempo de permanência no braço fechado mais iluminado. Os resultados demonstram que as doses de 2,0 e 8,0 mg/kg, em ambos os LCEs $F/F\Delta lux = 41$ e 85 lux, aumentaram a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos em relação ao controle, o que não foi visto para a dose de 1,0 mg/kg, sugerindo um efeito ansiolítico. Assim, observamos que a dose de 2,0 mg/kg não prejudicou a discriminação visual dos animais, pois não alterou as porcentagens de entradas e de tempo de permanência no braço fechado mais iluminado e também não alterou a atividade locomotora, sugerindo que esse efeito

ansiolítico foi decorrente de redução do medo. Agonistas ou antagonistas de receptores colinérgicos em algumas áreas como hipocampo, estriado e amígdala, melhoram ou prejudicam o aprendizado emocional no LCE e a memória em roedores (PEPEU & GIOVANNINI, 2004; GOLD, 2003). O tratamento com ESC na dose de 8,0 mg/kg aumentou a exploração nos braços abertos, mas também aumentou a porcentagem de tempo de permanência no braço fechado mais iluminado do labirinto. Portanto, o aumento na exploração dos braços abertos pode ser atribuído a um prejuízo na discriminação visual do animal, e/ou à redução do medo. Um aspecto importante nos estudos, utilizando antagonistas muscarínicos em testes de aprendizagem e memória, é o fato de o córtex visual e de a retina dos animais exibirem receptores muscarínicos (NOBILI & SANNITA, 1997); o bloqueio desses receptores poderia afetar a discriminação visual dos animais. Nesse sentido, o efeito amnésico da droga, e/ou prejudicial sobre a aprendizagem no LCE, poderiam ser atribuídos a um efeito da mesma sobre o sistema visual do animal e não diretamente nos circuitos neurais envolvidos com a aprendizagem. De fato, um estudo realizado com ratos no labirinto aquático demonstrou que a administração sistêmica de Escopolamina nas doses de 0,2 e 2,0 mg/kg alterou a memória espacial dos animais, mas, enquanto a dose menor prejudicou somente a memória espacial, a dose maior prejudicou a discriminação visual dos animais (ROBISON, HARBAN & RIEDEL, 2004). Portanto, esse estudo demonstrou que um efeito prejudicial da discriminação visual pode ser confundido com efeito amnésico. Em relação ao presente estudo, observamos que a dose de 2,0 mg/kg, que prejudicou a discriminação visual do animal no labirinto aquático, não alterou a discriminação do braço fechado mais iluminado nos LCEs com $F/F\Delta$ lux de 41 e 85 lux, o que nos leva a sugerir que o labirinto aquático é mais sensível para o prejuízo na

discriminação visual do animal, em relação ao LCE, que precisou de uma dose maior de ESC, para que pudesse promover prejuízo na discriminação visual.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, observamos que a detecção do efeito ansiolítico do Midazolam pode ser prejudicado pela baixa diferença de luminosidade entre os braços abertos e fechados do LCE. Assim sendo, um aspecto importante para a validade de predição do LCE é a linha basal de exploração dos braços abertos exibido pelo grupo controle. A literatura mostra que a luminosidade relativa entre os braços abertos e fechados ($A/F\Delta lux$), e não o nível absoluto de luminosidade entre os braços, é uma variável determinante para o estabelecimento basal em relação a exploração dos braços abertos. Assim, de acordo com o estabelecimento do $A/F\Delta lux$, a linha de base de variáveis espaciais temporais que representam a exploração dos braços abertos, pode ser significativamente alterada, sugerindo que com a diminuição do $A/F\Delta lux$, o conflito animal também diminui, resultando em um aumento da exploração dos braços abertos, porém não nos braços fechados (PEREIRA *et al.*, 2005). Mediante a isto, o presente estudo indica que quando incorporando um nível de $F/F\Delta lux$ para a avaliação da percepção visual do animal, é importante levar em consideração o resultado do nível de $A/F\Delta lux$, pois qualquer um dos dois efeitos teto ou efeito solo (esse último quando os animais são testados sob alta iluminação, eles exibem aumento da esquia dos braços abertos, que é indicativo de aumento do nível de ansiedade do animal, que por ventura pode vir a prejudicar a detecção de drogas ansiogênicas) sobre o comportamento basal do animal pode ser prejudicial para o LCE em detectar drogas ansiolíticas e ansiogênicas, respectivamente.

O presente estudo mostra que a introdução de um $F/F\Delta lux$ de 41 e 85 lux acrescenta ao LCE a capacidade de avaliação da discriminação visual do animal, sem

alterar as variáveis espaciais temporais padrões, tal como a exploração dos braços fechados e abertos, nem a capacidade do modelo em reconhecer drogas com potencial ansiolítico, o que é dificultoso em LCEs com seus braços fechados construídos com o mesmo material (vidro transparente com película fumê por exemplo). Com relação a construção dos LCEs alternativos, os LCEs com $F/F\Delta lux$ de 41 e 85 lux são simples e não demandam a construção de um novo LCE, desde que não é necessário alterar o assoalho do LCE, e o $F/F\Delta lux$ é obtido apenas por mudanças nas paredes dos braços fechados, em virtude de os mesmos serem rebatíveis. Em adição, exceto para o LCE com as uma das paredes dos braços fechados de madeira o $F/F\Delta lux$ pode ser simplesmente obtido por um revestimento externo em um dos braços fechados, como por exemplo um papelão.

Assim, acreditamos que a validade de predição do LCE fica fortalecida pela inclusão de um $F/F\Delta lux$, pois como demonstrado nos resultados, os LES 41 e 85 lux, são hábeis para avaliar a discriminação visual do animal e também reconhecem o real efeito ansiolítico do midazolam (aumento da exploração dos braços abertos, desprovidos de prejuízo na discriminação visual e, sem alterar a atividade locomotora dos animais), como também reconhecem drogas indutoras de prejuízo na discriminação visual, e assim, esses LCEs alternativos, previnem o pesquisador de obter resultados falso-positivos.

6. CONCLUSÕES

1. O LCE com $A/F\Delta Lux=8$ ($F/F\Delta Lux=10$), ou seja o vidro/vidro prejudicou a detecção do efeito ansiolítico induzido por MDZ (1.0 mg/kg), pois em virtude do baixo $A/F\Delta lux$, pode levar ao efeito teto, prejudicando assim, a detecção de drogas com potencial ansiolítico.
2. A inclusão de um $F/F\Delta lux$ de 41 ou 85, ou seja, fumê/vidro e fumê/madeira permitem avaliar a discriminação visual dos animais no LCE, sem alterar a preferência dos mesmos pelos braços fechados do labirinto.
3. A inclusão de um $F/F\Delta lux$ de 41 ou 85 no LCE não altera a atividade locomotora dos animais e nem as variáveis espaciais padrões, pois quando os ratos são testados nesses labirintos, eles apresentaram o mesmo nível de medo (a mesma % de entradas nos braços abertos, %tempo de permanência nos braços abertos e entradas nos braços abertos) e atividade locomotora (a mesma entrada nos braços fechados) em comparação com o LCE controle ($F/F\Delta lux=8$ fumê/fumê).
4. A utilização de um LCE com $F/F\Delta lux$ de 41 ou 85 permite a detecção do efeito ansiolítico do MDZ (1.0 mg/kg), desprovido de prejuízo na discriminação visual do animal.
5. A ESC na dose de 2.0 mg/kg induziu efeito ansiolítico desprovido de prejuízo na discriminação visual dos animais no LCE com $F/F\Delta lux$ de 41 e 85.

6. A ESC na dose de 8.0 mg/kg induziu efeito ansiolítico e/ou alteração na discriminação visual dos animais nos LCEs com F/F Δ Lux de 41 e 85.

7. Assim o uso dos LCEs F/F Δ lux de 41 e 85 lux permitem avaliar o nível de medo/ansiedade e a discriminação visual no mesmo animal, ou seja, nesses labirintos é possível avaliar discriminação visual de ratos sem alterar o conflito aproximação/esquiva.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4. ed... Washington, DC: American Psychiatric Press, 1994.

APPELBAUM, P. S. Controlling prescriptions of benzodiazepines. *Hosp. Community Psychiatry*, 43: 12-13, 1992.

BECKER, A.; GRECKSCH, G. Illumination has no effect on rat's behaviour in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.*, 59: 1175-7, 1996.

BERGINK, V.; VAN MEGEN, H. J.; WESTENBERG, H. G. Glutamate and anxiety. *Eur. Neuropsychopharmacology*, 14: 175-183, 2004.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Behavioural profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behav. Brain Res.*, 132: 135-43, 2002.

BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York: Raven Press, 1995.

CARDENAS, F.; LAMPREA, M. R.; MORATO, S. Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behaviour in the elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.*, 122: 169-74, 2001.

CRONBACH, L. J.; MEEHL, P. E. Construct validity in psychological tests. *Psychol. Bull.*, 52: 281-302, 1955.

FALTER, U.; GOWER, A. J.; GOBERT, J. Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influences. *Behav. Pharmacol.*, 3: 123-128, 1992.

GARCIA, A. M. B.; CARDENAS, F. P.; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physio Behav.*, 85: 265-270, 2005.

GOLD, P. E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiol Learn Mem.*, 80: 194-210, 2003.

GRAEFF, F. G. Brain defence systems and anxiety. In: ROTH, G.; BURROWS, G. D.; NOYES, R. (Eds). *Handbook of anxiety*. Amsterdam: Elsevier, 1990. vol. 3 (p. 307-57).

GRAEFF, F. G. *Drogas psicotrópicas e seu modo de ação*. 2 ed. São Paulo: EPU, 135p, 1989.

GRAEFF, F. G.; SILVEIRA, M. S. L.; NOGUEIRA, R. L., AUDI, E.A.; DE OLIVEIRA, R. M. W. Role of the amígdala in the periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav. Brain Res.*, 58: 123-31, 1993.

GRAY, J. A. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. *Behav. Brain Sci.*, 5: 469-484, 1982.

GRIEBEL, G.; MOREAU, J. L.; JENCK, F.; MARTIN, J.R.; MISSLIN, R. Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. *Behav. Proc.*, 29: 37-47, 1993.

GROSS, C.; HEN, R. The developmental origins of anxiety. *Nat Rev Neurosci.* 5: 545-552, 2004.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of $\alpha 2$ - adrenoceptor agonist and antagonist in a maze exploration model of fear- motivated behaviour. *N. S. Arch. Pharmacol.* 327: 1-5, 1984.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 54: 21-30, 1996.

JONES, N.; KING, S. M. Influence of circadian phase and test illumination on pre-clinical models of anxiety. *Physiol. Behav.*, 72: 99-106, 2001.

JULOU, L.; BLANCHARD, J. C.; DREYFUS, J. F. Pharmacological and clinical studies of cyclopyrrolones: zopiclone and suriclone. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 23: 653-659, 1985.

LeDOUX, J. Fear and the brain: where have we been and where are we going. *Biol. Psychiatry*, 44: 1229-1238, 1998.

LEPINE, J. P. The epidemiology of anxiety disorders: prevalence and societal costs. *J. Clin. Psychiatry*. 63: 4-8, 2003.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol. Ther.*, 46: 321-340, 1990.

MATTHYSSE, S. Animal models in psychiatric research. *Prog. Brain Res.*, 56: 259-70, 1986.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Psychol.*, 48: 254-60, 1955.

MORATO, S.; CASTRECHINI, P. Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22: 707-710, 1989.

MOSIER, C. I. A critical examination of the concepts of face validity. *Educ. Psychol. Meas.*, 7: 191-205, 1947.

NOBILI, L.; SANNITA, W. G. Cholinergic modulation. Visual function and Alzheimer's dementia. *Vision Res.*, 37: 35559-35571, 1997.

OTTONI, E.B. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav. Res. Instrum. Comput.*, 32: 446-449, 2000.

PELLOW, S., CHOPIN, P.; FILE, S.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 14: 149-67, 1985.

PEPEU, G.; GIOVANNINI, M. G. Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. *Learn Mem.*, 11: 21-27, 2004.

PEREIRA, L. O.; CUNHA, I. C.; NETO, J. M.; PASCHOALINI, M. A.; FARIA, M. S. The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze. *Behav. Brain Res.*, 159: 55-61, 2005.

ROBINSON, L.; HARBAN, D.; RIEDEL, G. Visual acuity in the water maze: sensitivity to muscarinic receptor blockade in rats and mice *Behav. Brain Res.*, 151: 277-286, 2004.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30: 289-304, 1997.

SALUM, C.; MORATO, S.; ROQUE-DA-SILVA, A. C. Anxiety-like behavior in rats: a computational model. *Neural Netw.*, 13: 21-29, 2000.

SANFORD, J. J.; ARGYROPOULOS, S.V.; NUTT, D. J The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: basic neurobiology. *Pharmacol. Therapeutics*, 88:197-212, 2000.

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 31: 959-962, 1988.

VAN DER STAAY, F. J. Animal models of behavioral dysfunctions: basic concept and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Res. Rev.*, 52: 131-159, 2006.

VAN RIEZEN, H.; SEGAL, M. *Introduction to the evaluation of anxiety and related disorders*. New York: Elsevier, 225-228, 1988.

ANEXOS

ANEXO 1

CARTA DE SUBMISSÃO DO PAPER

----- Forwarded message from BBR@uni-duesseldorf.de -----
Date: Sun, 14 Jan 2007 03:00:29 -0000
From: BBR@uni-duesseldorf.de
Reply-To: BBR@uni-duesseldorf.de
Subject: Submission Confirmation
To: serralvo@ccb.ufsc.br

Dear Dr. Moacir Serralvo Faria,

Your submission entitled "AN APPROACH TO EVALUATE THE ABILITY OF RATS TO DISCRIMINATE DIFFERENT LEVELS OF ILLUMINATION IN THE PLUS MAZE TEST: EFFECT OF THE SCOPOLAMINE." has been received by Behavioural Brain Research.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Behavioural Brain Research